

PCT/JPG0/06963

日 本 国 特 許 庁

05.10.00

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

JPG0/6963

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application:

2000年 6月 2日

REC'D 28 NOV 2000

出 願 番 号  
Application Number:

特願2000-166726

WIPO PCT

出 願 人  
Applicant(s):

科学技術振興事業団  
財団法人大阪バイオサイエンス研究所  
オリエンタル酵母工業株式会社

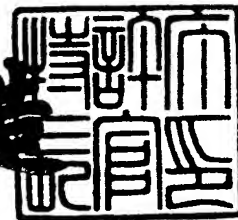
EJU

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年11月10日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2000-3092622



【書類名】 特許願

【整理番号】 NP00242-YS

【提出日】 平成12年 6月 2日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A01K 67/027

【発明の名称】 ヒト遺伝子大量発現動物とこの動物を用いた試験方法

【請求項の数】 5

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市中京区西洞院通蛸薬師下ル古西町440  
藤和シティー  
コープ706号

【氏名】 裏出 良博

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府堺市浜寺昭和町5-607-1

【氏名】 藤谷 靖志

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市西京区御陵峰ヶ堂町3丁目5番地の12

【氏名】 北山 博章

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市泉区上飯田町2838-4

【氏名】 林 直木

【特許出願人】

【識別番号】 396020800

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【特許出願人】

【識別番号】 390000745

【氏名又は名称】 財団法人大阪バイオサイエンス研究所

【特許出願人】

【識別番号】 000103840



【氏名又は名称】 オリエンタル酵母工業株式会社  
【代理人】

【識別番号】 100093230

【弁理士】

【氏名又は名称】 西澤 利夫

【電話番号】 03-5454-7191

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成11年特許願第284610号

【出願日】 平成11年10月 5日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 009911

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要



【書類名】 明細書

【発明の名称】 ヒト遺伝子大量発現動物とこの動物を用いた試験方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ヒト・プロスタグランジン  $D_2$  合成酵素遺伝子を導入した非ヒト動物の全能性細胞を個体発生して得られる非ヒト動物およびその子孫動物であって、体細胞染色体中に上記遺伝子を保有し、ヒト・プロスタグランジン  $D_2$  合成酵素を大量発現することを特徴とするヒト遺伝子大量発現動物。

【請求項 2】 非ヒト動物がマウスである請求項 1 のヒト遺伝子大量発現動物。

【請求項 3】 抗アレルギー薬候補物質の個体内活性を試験する方法であって、請求項 1 または 2 のヒト遺伝子大量発現動物に候補物質を投与し、この動物のアレルギー反応を測定することによって、候補物質の活性を評価することを特徴とする方法。

【請求項 4】 睡眠調節物質の個体内活性を試験する方法であって、請求項 1 または 2 のヒト遺伝子大量発現動物に候補物質を投与し、この動物の睡眠状態を測定することによって、候補物質の活性を評価することを特徴とする方法。

【請求項 5】 肥満および脂肪細胞分化調節物質の個体内活性を試験する方法であって、請求項 1 または 2 のヒト遺伝子大量発現動物に候補物質を投与し、この動物の肥満状態を測定することによって、候補物質の活性を評価することを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この出願の発明は、ヒト遺伝子大量発現動物と、この動物を用いた各種試験方法に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、アレルギー発症、睡眠誘発の原因物質の一つであるプロスタグランジン  $D_2$  を産生するヒト PGD 合成酵素 (H-PGDS) をコードする遺伝子を体細胞染色体中に保有し、この酵素を大量発現する非ヒト・トランスジェニック動物と、この動物を用いてアレルギー疾患、睡眠疾患、肥満等の生活習慣病等の予防または治療薬の有効成分を



試験する方法に関するものである。

#### 【0002】

##### 【従来の技術】

H-PGDS (Biochem. Biophys. Acta 572:43-51, 1979; J. Biol. Chem. 262:3820-3825, 1987; Cell 90:1085-1095, 1997) は、各種の生理活性を有する体内物質プロスタグランジン $D_2$  (PGD $_2$ : Prostaglandins Leukotrienes Essential Fatty Acids 37:219-234, 1989; FASEB J. 5:2575-2581, 1991; J. Lipid Mediators Cell Signalling, 14:71-82, 1996) の産生機能を有する酵素であり、免疫担当細胞、生殖器官 (J. Immunol. 143:2982-2989, 1989; J. Biol. Chem. 270:3239-3246, 1995) に発現する。H-PGDSにより肥満細胞から産生されるPGD $_2$ が炎症の増悪に関与することや、PGD $_2$ の分解物質である15d-PGJ $_2$ が脂肪細胞の分化因子であることが知られている。

#### 【0003】

II-PGDSは肥満細胞、抗原提示細胞に存在し (J. Immunol 143:2982-2989, 1989; J. Biol. Chem. 270:3239-3246, 1995)、アレルギー炎症反応におけるPGD $_2$ の産生に関わっている。産生されたPGD $_2$ は気管収縮、血管拡張を引き起こしアレルギーの増悪に関わっていることが知られている。

#### 【0004】

また、PGD $_2$ は現在までに明らかにされている内因性睡眠誘発物質のうちで最も強い催眠作用を示す。ヒトにおいてトリパノソーマ感染によるアフリカ睡眠病看者において、病状の進行に伴い脳脊髄液中のPGD $_2$ レベルが100-1,000倍上昇することが報告されている (Trans Royal Soc Trop Med Hyg 84:795-799, 1990)。さらに全身性肥満細胞増多症の患者に見られる病理的な深い眠りにおいても血液中のPGD $_2$ のレベルが150倍も上昇することが知られており (New Engl. J. Med. 303:1400-1494, 1980)、病的睡眠におけるPGD $_2$ の重要な役割が示唆されている。

#### 【0005】

##### 【発明が解決しようとする課題】

以上のとおり、PGD $_2$ とこれを産生するH-PGDSが生物個体の様々な生



理機能に密接に関係しており、ヒト疾患要因になることが示唆されている。しかしながら、H-PGDSの大量発現が動物個体に対してどの様に作用するのかについて、統制された条件下での研究を可能とするモデル動物系は確立されていない。

## 【0006】

この出願の発明は以上のとおりの事情を鑑みてなされたものであって、遺伝的にH-PGDS活性を大量に発現している非ヒト動物個体を提供することを課題としている。またこの出願は、この動物個体を用い、H-PGDSの大量発現によって生じる各種疾患の予防もしくは治療物質の有効性を試験する方法を提供することを課題ともしている。

## 【0007】

## 【課題を解決するための手段】

この出願は、前記の課題を解決するため、以下の(1)～(5)の発明を提供する。

- (1) ヒト・プロスタグランジンD<sub>2</sub>合成酵素遺伝子を導入した非ヒト動物の全能性細胞を個体発生して得られる非ヒト動物およびその子孫動物であって、体細胞染色体中に上記遺伝子を保有し、ヒト・プロスタグランジンD<sub>2</sub>合成酵素を大量発現することを特徴とするヒト遺伝子大量発現動物。
- (2) 非ヒト動物がマウスである前記(1)のヒト遺伝子大量発現動物。
- (3) 抗アレルギー薬候補物質の個体内活性を試験する方法であって、前記(1)または(2)のヒト遺伝子大量発現動物に候補物質を投与し、この動物のアレルギー反応を測定することによって、候補物質の活性を評価することを特徴とする方法。
- (4) 睡眠調節物質の個体内活性を試験する方法であって、前記(1)または(2)のヒト遺伝子大量発現動物に候補物質を投与し、この動物の睡眠状態を測定することによって、候補物質の活性を評価することを特徴とする方法。
- (5) 肥満および脂肪細胞分化調節物質の個体内活性を試験する方法であって、前記(1)または(2)のヒト遺伝子大量発現動物に候補物質を投与し、この動物の肥満状態を測定することによって、候補物質の活性を評価することを特徴とする方法。



【 0 0 0 8 】

## 【発明の実施の形態】

導入遺伝子であるヒトH-PGDS遺伝子は、そのcDNAを用いることができる。このH-PGDS cDNAは公知の配列 (Cell 90:1085-1095, 1997) の任意部分の塩基配列に基づいてオリゴヌクレオチドを合成し、これをプローブとして用いてヒトcDNAライブラリーをスクリーニングする方法や、目的とするcDNA断片の両末端にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを合成し、これをプライマーとして用いてヒト細胞から単離したmRNAからRT-PCR法により調製することもできる。

【 0 0 0 9 】

また、導入遺伝子には、その発現を制御するためのプロモーター配列やエンハンサー配列を連結する。

【 0 0 1 0 】

前記発明(1)のヒト遺伝子大量発現動物は、公知のトランスジェニック動物作製法 (例えば、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:7380-7384, 1980) に従って作成することができる。すなわち、前記導入遺伝子を非ヒト動物の全能性細胞に導入し、この細胞を個体へと発生させ、体細胞のゲノム中に導入遺伝子が組み込まれた個体を選別することによって目的とするトランスジェニック動物を作製することができる。非ヒト動物としては、技術的には全ての動物種を対象とすることが可能であるが、特に近交系が多数作出されており、しかも受精卵の培養、体外受精等の技術が整っているマウスが最適である。遺伝子を導入する全能性細胞としては、マウスの場合、受精卵や初期胚を用いることができる。また培養細胞への遺伝子導入法としては、トランスジェニック動物個体の産出高率や次代への導入遺伝子の伝達効率を考慮した場合、DNAの物理的注入 (マイクロインジェクション) 法が最適である。

【 0 0 1 1 】

遺伝子を注入した受精卵は、次に仮親の卵管に移植され、個体まで発生し出生した動物を里親につけて飼育させたのち、体の一部 (尾部先端) からDNAを抽出し、サザン解析やPCR法により導入遺伝子の存在を確認する。導入遺伝子の



存在が確認された個体を初代 (Founder) とすれば、導入遺伝子はその子孫の50%に伝達され、野性型または変異型の動物を効率よく作出することが可能である。

【0 0 1 2】

このようにして作出されたトランスジェニック動物はH-PGD Sを過剰産生するため、そのPGD<sub>2</sub>の生理作用を検討する最適のモデルとなりうる。

【0 0 1 3】

この出願の前記(3)の発明は、前記発明(1)のヒト遺伝子大量発現動物に抗アレルギー薬候補物質を投与し、この動物のアレルギー反応を測定することによって、候補物質の個体内活性を試験する方法である。すなわち、前記発明(1)のトランスジェニック動物は、H-PGD Sを大量に保有することによってPGD<sub>2</sub>を大量に産生するため、各種のアレルゲンに対して敏感に反応する。従って、例えば、任意のアレルゲンを事前に投与し、次いで、抗アレルギー薬の候補物質を投与して、動物の全身アレルギー反応を測定することによって、候補物質の薬効を評価することができる。

【0 0 1 4】

この出願の前記(4)の発明は、前記発明(1)のヒト遺伝子大量発現動物に睡眠調節のための候補物質を投与し、この動物の睡眠状態を測定することによって、候補物質の個体内活性を試験する方法である。すなわち、前記発明(1)のトランスジェニック動物は、H-PGD Sを大量に保有することによってPGD<sub>2</sub>を大量に産生するため、その強い催眠作用により睡眠調節に変調をきたしている。従って、例えば、睡眠調節のための候補物質（例えば、覚醒状態を持続させる物質等）を投与して、動物の覚醒・睡眠状態を測定することによって、候補物質の薬効を評価することができる。覚醒・睡眠状態の測定は、活動量や摂食・節水量を計測したり、あるいは脳波や筋電位等の生理的指標を計測することによって行うことができる。

【0 0 1 5】

この出願の前記(5)の発明は、前記発明(1)のヒト遺伝子大量発現動物に抗肥満薬候補物質を投与し、この動物の肥満の程度（体重、脂肪組織重量など）を測定することによって、候補物質の個体内活性を試験する方法である。すなわち、前



記発明(1)のトランスジェニック動物は、H-PGDSを大量に保有することによってPGD<sub>2</sub>を大量に産生するため、体重増加や脂肪組織重量の増加に関与する15d-PGJ<sub>2</sub> (15-deoxy $\Delta^{12,14}$ PGJ<sub>2</sub>) も大量に産生され、肥満状態を呈する。従って、例えば、抗肥満薬候補物質を投与して、動物の肥満の程度を測定することによって、候補物質の薬効を評価することができる。

## 【0016】

以下、実施例を示して前記の発明をさらに詳細かつ具体的に説明するが、この出願の発明は以下の例によって限定されるものではない。

## 【0017】

## 【実施例】

## 実施例1

## (1) トランスジェニックマウスの作製

ヒト細胞のmRNAから調製したcDNAライブラリーから、ラットH-PGDS遺伝子のcDNAをプローブとしてヒトH-PGDSのcDNAをクローニングした。

## 【0018】

次にベクター (pCAGGS) のクローニング部位 (Sal I/Not I) にヒトH-PGDSのcDNAを挿入結合し、導入ベクターを構築した。図1は、この導入ベクターにおける導入遺伝子の構成である。

## 【0019】

この導入ベクターをマイクロインジェクション法によってFVBマウスの受精卵に注入した。遺伝子導入受精卵は定法に従って仮親の卵管に移植し、個体へと発生させ出生させた。

## 【0020】

得られたマウス個体の尾部からDNAを抽出し、導入遺伝子の配列にもとづき合成されたプローブを用い、サザン解析法によりトランスジェニックマウスを選別した。H-PGDS遺伝子の発現量のことなる独立した3系統のトランスジェニックマウスを確立した。結果は図2に示したとおりである。

## (2) トランスジェニックマウスの遺伝子発現の検討



トランスジェニックマウスの全身における導入遺伝子の発現をサザン解析法により調べた。その結果 S 5 5 マウスにおいて、H-PGD S 遺伝子は骨格筋、心臓、肺、大腸、肝臓に高レベルで発現していることが確認された。結果は図 3 に示したとおりである。

### (3) トランスジェニックマウスの PGD 酵素活性の検討

トランスジェニックマウスの各種臓器における PGD 酵素活性を、基質である  $\text{PGH}_2$  を用いて調べた。各種臓器においてトランスジェニックマウスでは酵素活性に著しい増加がみられた。また 3 系統間で比較したところ、 $S 5 5 > S 4 1 > S 6 6$  の順で酵素活性の増加が観察された。結果は図 4 に示したとおりである。

### 実施例 2

実施例 1 で得たトランスジェニックマウスを用い、ヒト喘息のモデルである抗原誘発肺炎モデルにおいて解析を行った。

#### 【0021】

トランスジェニックマウスでは抗原チャレンジ後の好酸球の肺への浸潤が、野性型に比べ有意に増加していることが観察された。結果は図 5 に示したとおりである。

#### 【0022】

以上の結果から、この発明のトランスジェニックマウスはアレルギー発症の機構を解明するためのモデル動物として有用であり、新規抗アレルギー物質をスクリーニングする系として有効であることが確認された。

### 実施例 3

実施例 1 で得たトランスジェニックマウスにリポポリサッカロイドを腹腔内投与し、炎症時の睡眠発作における解析を行った。

#### 【0023】

高濃度 (20 mg/kg) のリポポリサッカロイドを投与後、トランスジェニックマウスの自発的行動量を観察したところ、野性型に比べ有意に低下していた。このことはトランスジェニックマウスにおいては睡眠時間が増加していることを示唆するものである。結果は図 6 に示したとおりである。



## 【0024】

以上の結果から、この発明のトランスジェニックマウスは睡眠誘発の機構を解明するためのモデル動物としても、また睡眠・覚醒リズムの新規調節物質をスクリーニングする系としても有効であることが確認された。

## 実施例 4

実施例 1 で得たトランスジェニックマウスに対して高脂肪食負荷を行い、肥満の進行を解析した。

## 【0025】

高脂肪食負荷 6 週間の体重増加を観察したところ、野生型マウスに比べ、トランスジェニックマウスでは体重が有意に増加した。さらに、トランスジェニックマウスでは白色脂肪組織重量も有意に増加していた。結果は図 7 に示したとおりである。

## 【0026】

## 【発明の効果】

以上詳しく説明したとおり、この発明によって、H-PGDS を大量発現するトランスジェニック動物が提供される。これらの動物によって、ヒト各種疾患の治療薬剤等の開発が促進される。

## 【図面の簡単な説明】

## 【図 1】

この発明のトランスジェニックマウスの作成に用いた導入ベクターの構造を示す模式図である。

## 【図 2】

3 系統のトランスジェニックならびに野生型マウスの各種臓器より抽出した mRNA のノーザンプロット解析の結果である。

## 【図 3】

トランスジェニックマウスの全身臓器から抽出した mRNA のノーザンプロット解析の結果である。

## 【図 4】

3 系統のトランスジェニックならびに野生型マウスの各種臓器より抽出したタ



ンパク質分画を用いた、H-PGDS 酵素活性の結果である。

【図 5】

抗原に免疫を施したトランスジェニックならびに野性型マウスに生理的食塩水もしくは抗原を暴露した後の肺胞洗浄液中の炎症性細胞の細胞数を計測した結果である。

【図 6】

トランスジェニックならびに野性型マウスにリポポリサッカロイド (20 mg/kg) を腹腔内投与し後に、12時間の自発的行動量を測定した結果である。

【図 7】

トランスジェニックならびに野生型マウスを高脂肪食で飼育し、体重変化を測定した結果 (A) と、両マウスを通常食および高脂肪食で飼育した場合の白色脂肪組織重量を測定した結果 (B) である。

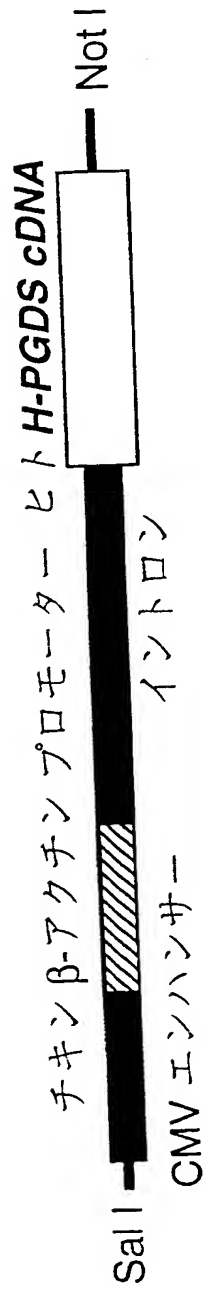


【書類名】

図面

【図1】

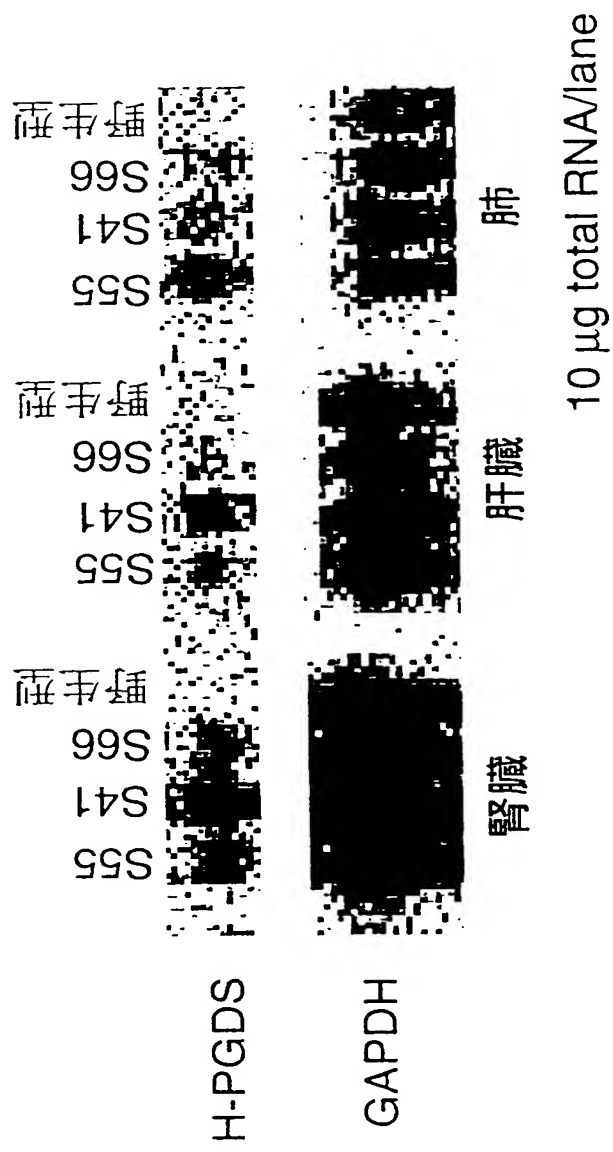
# H-PGDS導入ベクターの構造





【図2】

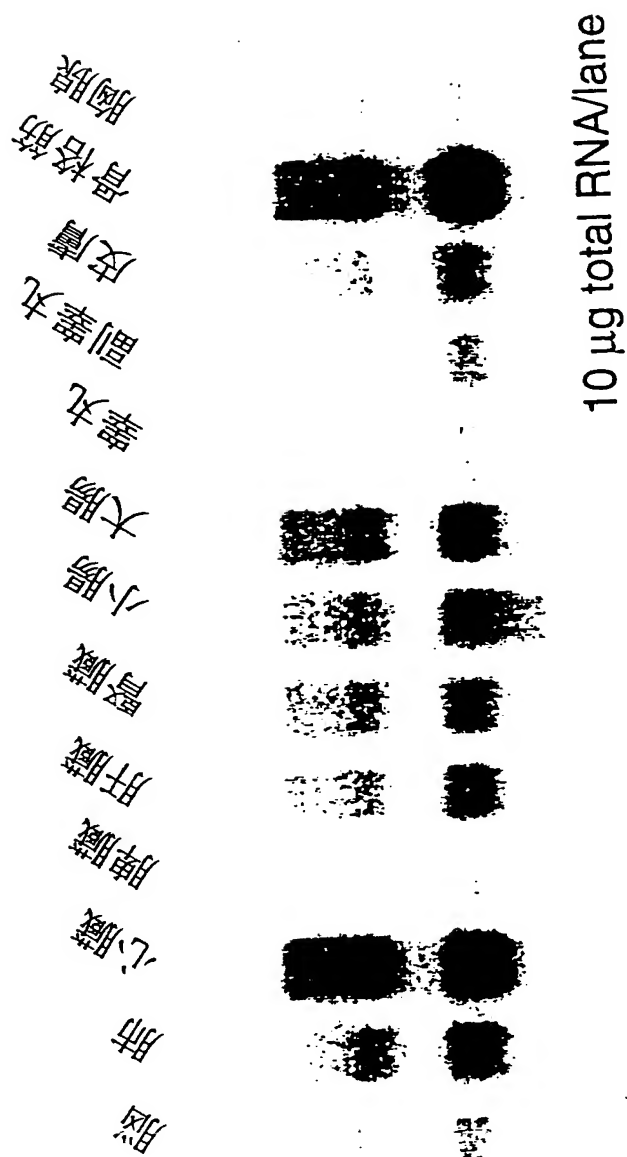
3系統のトランスジェニックマウスの遺伝子発現





【図3】

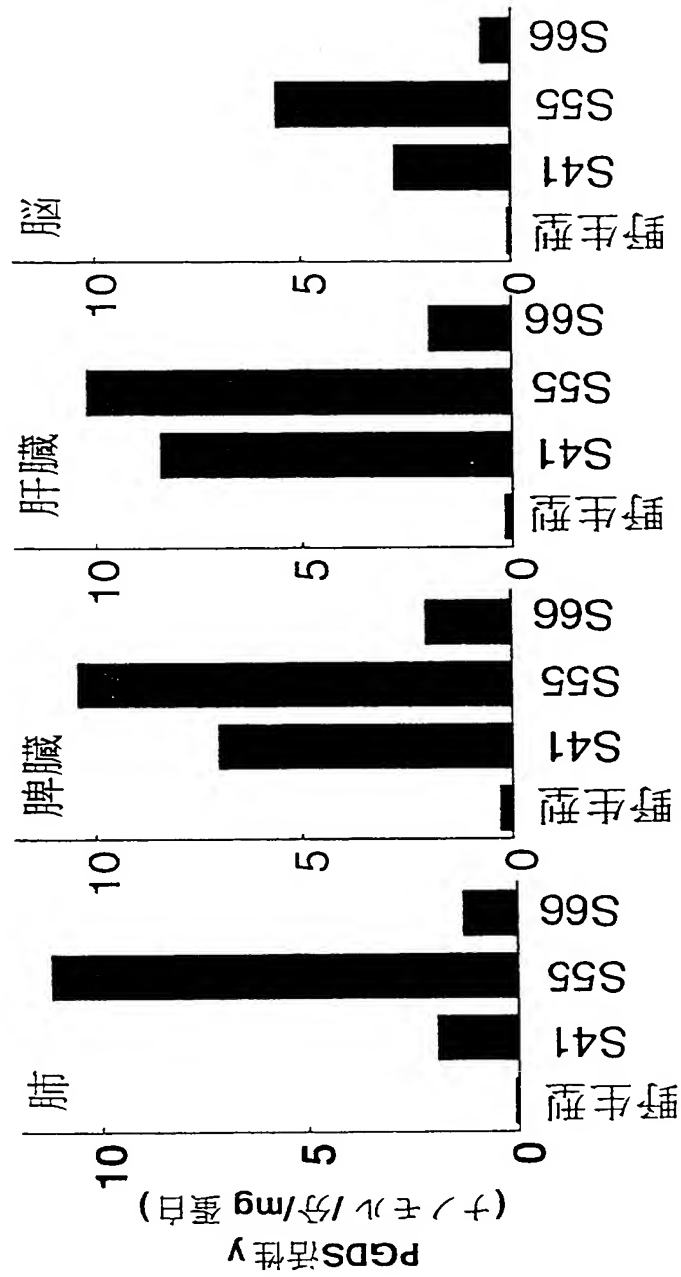
トランスジェニックマウスにおける H-PGDS遺伝子の組織分布





【図4】

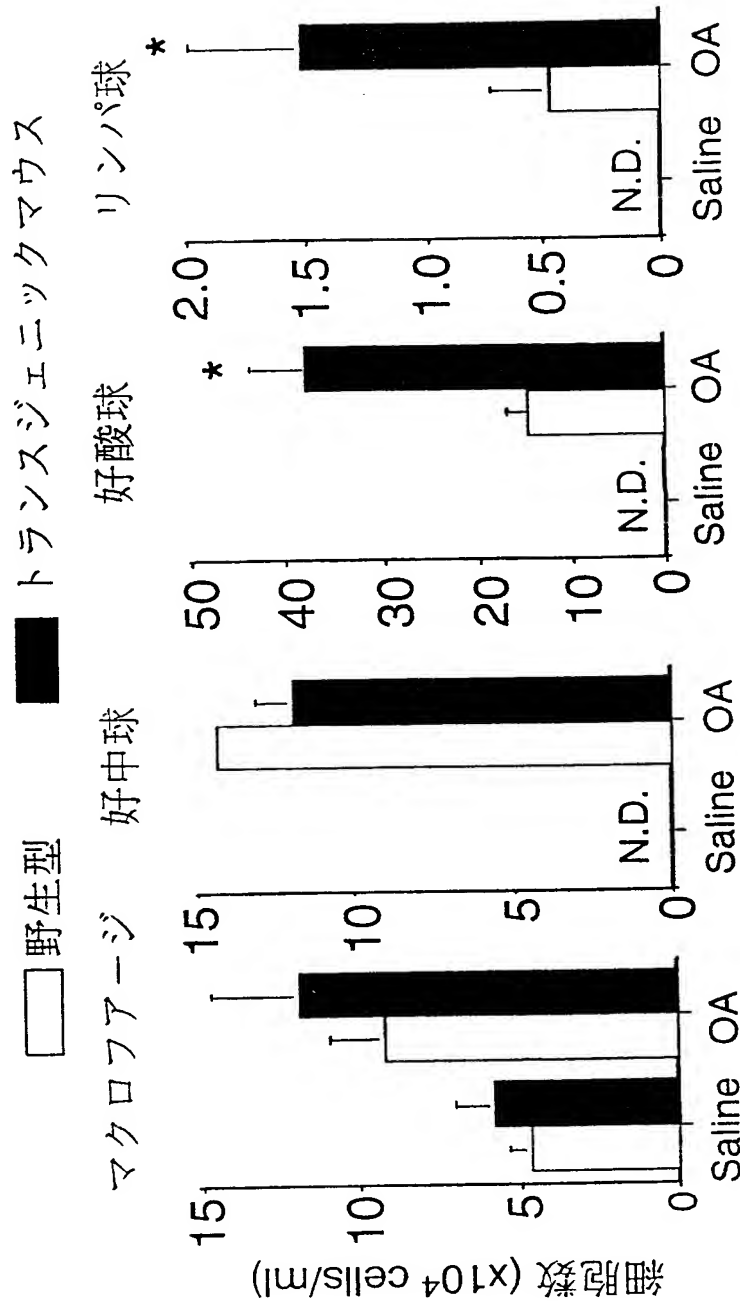
トランスジェニックマウスにおける H-PGDS 酵素活性





【図 5】

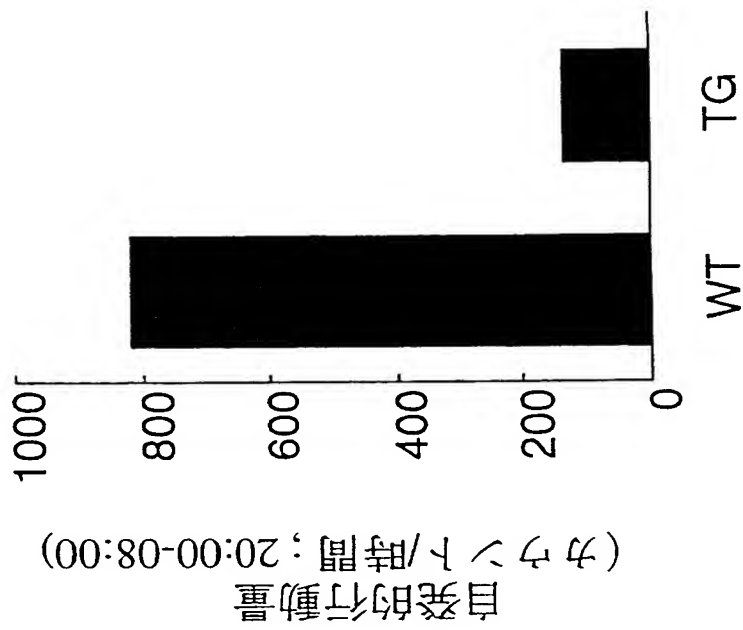
# H-PGDS TG マウスにおける抗原誘発肺炎症の増悪





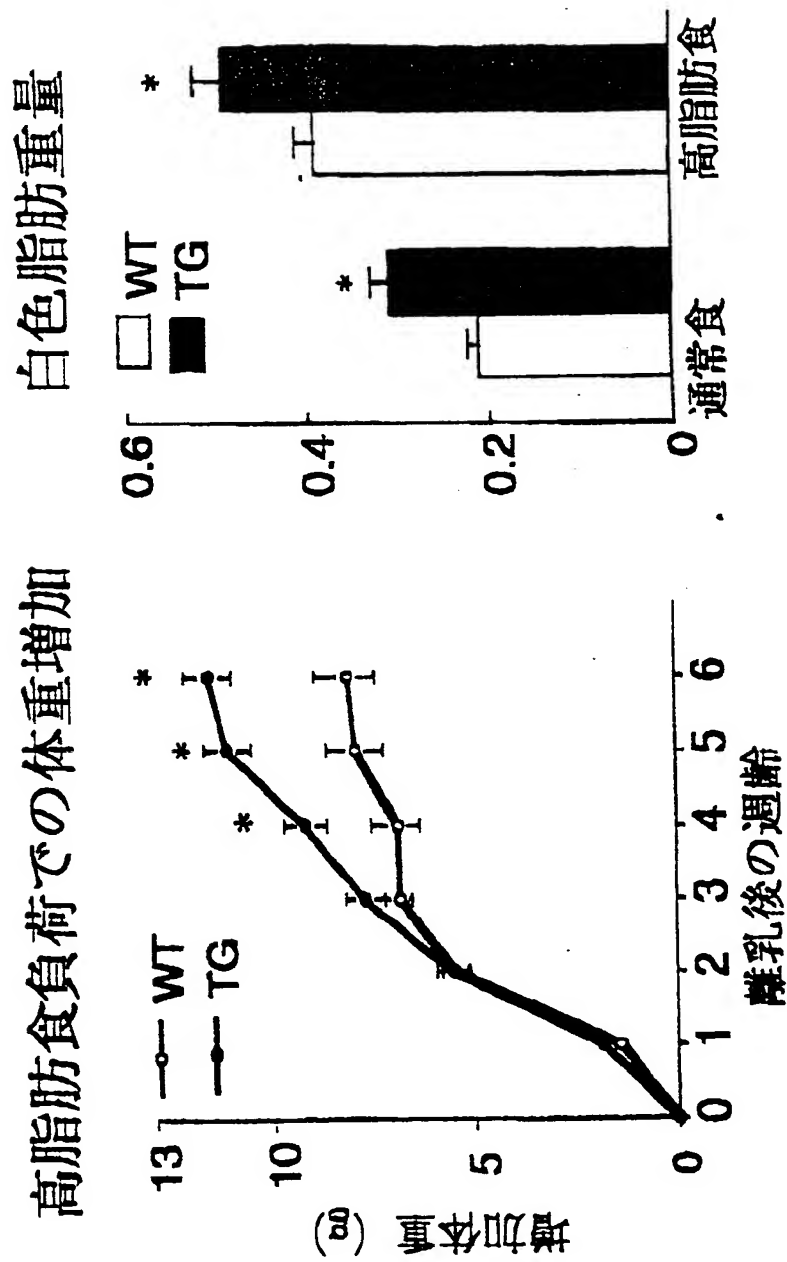
【図 6】

リポポリサッカロイド刺激後の自発的行動量





【図 7】





【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 遺伝的にヒト・プロスタグランジンD<sub>2</sub>を大量に発現している非ヒト動物、この動物を用いた各種試験方法を提供する。

【解決手段】 ヒト・プロスタグランジンD<sub>2</sub>合成酵素遺伝子を導入した非ヒト動物の全能性細胞を個体発生して得られる非ヒト動物およびその子孫動物であって、体細胞染色体中に上記遺伝子を保有し、ヒト・プロスタグランジンD<sub>2</sub>合成酵素を大量発現することを特徴とするヒト遺伝子大量発現動物と、この動物を用いて、抗アレルギー薬候補物質、睡眠調節物質および抗肥満薬候補物質の個体内活性を試験する方法。

【選択図】 なし



出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[396020800]

1. 変更年月日	1998年 2月24日
[変更理由]	名称変更
住 所	埼玉県川口市本町4丁目1番8号
氏 名	科学技術振興事業団



出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[390000745]

1. 変更年月日

1990年 9月21日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府吹田市古江台6丁目2番4号

氏 名

財団法人大阪バイオサイエンス研究所



出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000103840]

1. 変更年月日

1990年 8月28日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都板橋区小豆沢3丁目6番10号

氏 名

オリエンタル酵母工業株式会社







PCT/JPGG/06963

日 本 国 特 許 庁

05.10.00

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

JP00/6963

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application:

1999年10月 5日

REC'D 28 NOV 2000

WIPO PCT

出 願 番 号  
Application Number:

平成11年特許願第284610号

EJU

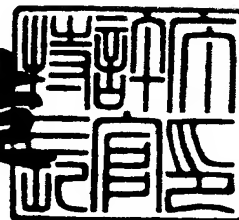
出 願 人  
Applicant(s):

科学技術振興事業団  
財団法人大阪バイオサイエンス研究所  
オリエンタル酵母工業株式会社

2000年11月10日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2000-3092510



【書類名】 特許願  
 【整理番号】 NP99186-YS  
 【提出日】 平成11年10月 5日  
 【あて先】 特許庁長官 殿  
 【国際特許分類】 A01K 67/00  
 【発明の名称】 ヒト遺伝子大量発現動物とこの動物を用いた試験方法  
 【請求項の数】 4

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市中京区西洞院通蛸薬師下ル古西町 4 4 0

藤和シティー

コープ 7 0 6 号

【氏名】 裏出 良博

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府堺市浜寺昭和町 5 - 6 0 7 - 1

【氏名】 藤谷 靖志

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市西京区御陵峰ヶ堂町 3 丁目 5 番地の 1 2

【氏名】 北山 博章

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市泉区上飯田町 2 8 3 8 - 4

【氏名】 林 直木

【特許出願人】

【識別番号】 396020800

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【特許出願人】

【識別番号】 390000745

【氏名又は名称】 財団法人大阪バイオサイエンス研究所

【特許出願人】

【識別番号】 000103840



【氏名又は名称】 オリエンタル酵母工業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100093230

【弁理士】

【氏名又は名称】 西澤 利夫

【電話番号】 03-5454-7191

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 009911

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要



【書類名】 明細書

【発明の名称】 ヒト遺伝子大量発現動物とこの動物を用いた試験方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ヒト・プロスタグランジン  $D_2$  合成酵素遺伝子を導入した非ヒト動物の全能性細胞を個体発生して得られる非ヒト動物およびその子孫動物であって、体細胞染色体中に上記遺伝子を保有し、ヒト・プロスタグランジン  $D_2$  合成酵素を大量発現することを特徴とするヒト遺伝子大量発現動物。

【請求項 2】 非ヒト動物がマウスである請求項 1 のヒト遺伝子大量発現動物。

【請求項 3】 抗アレルギー薬候補物質の個体内活性を試験する方法であって、請求項 1 または 2 のヒト遺伝子大量発現動物に候補物質を投与し、この動物のアレルギー反応を測定することによって、候補物質の活性を評価することを特徴とする方法。

【請求項 4】 睡眠調節物質の個体内活性を試験する方法であって、請求項 1 または 2 のヒト遺伝子大量発現動物に候補物質を投与し、この動物の睡眠状態を測定することによって、候補物質の活性を評価することを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この出願の発明は、ヒト遺伝子大量発現動物と、この動物を用いた各種試験方法に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、アレルギー発症、睡眠誘発の原因物質の一つであるプロスタグランジン  $D_2$  を産生するヒト PGD 合成酵素 (H-PGDS) をコードする遺伝子を体細胞染色体中に保有し、この酵素を大量発現する非ヒト・トランスジェニック動物と、この動物を用いてアレルギー疾患や睡眠疾患等の予防または治療薬の有効成分を試験する方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

H-PGDS (Biochem. Biophys. Acta 572:43-51, 1979; J. Biol. Chem. 2



62:3820-3825, 1987; Cell 90:1085-1095, 1997) は、各種の生理活性を有する体内物質プロスタグランジン $D_2$  (PG $D_2$ : Prostaglandins Leukotrienes Essent. Fatty Acids 37:219-234, 1989; FASEB J.5:2575-2581, 1991; J. Lipid Mediators Cell Signalling, 14:71-82, 1996) の産生機能を有する酵素であり、免疫担当細胞、生殖器官 (J. Immunol. 143:2982-2989, 1989; J. Biol. Chem. 270:3239-3246, 1995) に発現する。H-PGDSにより肥満細胞から産生されるPG $D_2$ が炎症の増悪に関与することや、PG $D_2$ の分解物質である15d-PGJ $_2$ が脂肪細胞の分化因子であることが知られている。

【0003】

H-PGDSは肥満細胞、抗原提示細胞に存在し (J. Immunol 143:2982-2989, 1989; J. Biol. Chem. 270:3239-3246, 1995)、アレルギー炎症反応におけるPG $D_2$ の産生に関わっている。産生されたPG $D_2$ は気管収縮、血管拡張を引き起こしアレルギーの増悪に関わっていることが知られている。

【0004】

また、PG $D_2$ は現在までに明らかにされている内因性睡眠誘発物質のうちで最も強い催眠作用を示す。ヒトにおいてトリパノソーマ感染によるアフリカ睡眠病看者において、病状の進行に伴い脳脊髄液中のPG $D_2$ レベルが100-1,000倍上昇することが報告されている (Trans Royal Soc Trop Med Hyg 84:795-799, 1990)。さらに全身性肥満細胞増多症の患者に見られる病理的な深い眠りにおいても血液中のPG $D_2$ のレベルが150倍も上昇することが知られており (New Engl. J. Engl. J. Med. 303:1400-1494, 1980)、病的睡眠におけるPG $D_2$ の重要な役割が示唆されている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

以上のとおり、PG $D_2$ とこれを産生するH-PGDSが生物個体の様々な生理機能に密接に関係しており、ヒト疾患要因になることが示唆されている。しかしながら、H-PGDSの大量発現が動物個体に対してどの様に作用するのかについて、統制された条件下での研究を可能とするモデル動物系は確立されていない。



## 【0006】

この出願の発明は以上のとおりの事情を鑑みてなされたものであって、遺伝的にH-PGDS活性を大量に発現している非ヒト動物個体を提供することを課題としている。またこの出願は、この動物個体を用い、H-PGDSの大量発現によって生じる各種疾患の予防もしくは治療物質の有効性を試験する方法を提供することをも課題としている。

## 【0007】

## 【課題を解決するための手段】

この出願は、前記の課題を解決するため、以下の(1)～(4)の発明を提供する。

(1) ヒト・プロスタグランジンD<sub>2</sub>合成酵素遺伝子を導入した非ヒト動物の全能性細胞を個体発生して得られる非ヒト動物およびその子孫動物であって、体細胞染色体中に上記遺伝子を保有し、ヒト・プロスタグランジンD<sub>2</sub>合成酵素を大量発現することを特徴とするヒト遺伝子大量発現動物。

(2) 非ヒト動物がマウスである前記(1)のヒト遺伝子大量発現動物。

(3) 抗アレルギー薬候補物質の個体内活性を試験する方法であって、前記(1)または(2)のヒト遺伝子大量発現動物に候補物質を投与し、この動物のアレルギー反応を測定することによって、候補物質の活性を評価することを特徴とする方法。

(4) 睡眠調節物質の個体内活性を試験する方法であって、前記(1)または(2)のヒト遺伝子大量発現動物に候補物質を投与し、この動物の睡眠状態を測定することによって、候補物質の活性を評価することを特徴とする方法。

## 【0008】

## 【発明の実施の形態】

導入遺伝子であるヒトH-PGDS遺伝子は、そのcDNAを用いることができる。このH-PGDS cDNAは公知の配列 (Cell 90:1085-1095, 1997) の任意部分の塩基配列に基づいてオリゴヌクレオチドを合成し、これをプローブとして用いてヒトcDNAライブラリーをスクリーニングする方法や、目的とするcDNA断片の両末端にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを合成し、これをプライマーとして用いてヒト細胞から単離したmRNAからRT-PCR法に



より調製することもできる。

【0009】

また、導入遺伝子には、その発現を制御するためのプロモーター配列やエンハンサー配列を連結する。

前記発明(1)のヒト遺伝子大量発現動物は、公知のトランスジェニック動物作製法（例えば、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:7380-7384, 1980）に従って作成することができる。すなわち、前記導入遺伝子を非ヒト動物の全能性細胞に導入し、この細胞を個体へと発生させ、体細胞のゲノム中に導入遺伝子が組み込まれた個体を選別することによって目的とするトランスジェニック動物を作製することができる。非ヒト動物としては、技術的には全ての動物種を対象とすることが可能であるが、特に近交系が多数作出されており、しかも受精卵の培養、体外受精等の技術が整っているマウスが最適である。遺伝子を導入する全能性細胞としては、マウスの場合、受精卵や初期胚を用いることができる。また培養細胞への遺伝子導入法としては、トランスジェニック動物個体の産出高率や次代への導入遺伝子の伝達効率を考慮した場合、DNAの物理的注入（マイクロインジェクション）法が最適である。

【0010】

遺伝子を注入した受精卵は、次に仮親の卵管に移植され、個体まで発生し出生した動物を里親につけて飼育させたのち、体の一部（尾部先端）からDNAを抽出し、サザン解析やPCR法により導入遺伝子の存在を確認する。導入遺伝子の存在が確認された個体を初代（Founder）とすれば、導入遺伝子はその子孫の50%に伝達され、野性型または変異型の動物を効率よく作出することが可能である。

【0011】

このようにして作出されたトランスジェニック動物はH-PGD<sub>2</sub>Sを過剰産生するため、そのPGD<sub>2</sub>の生理作用を検討する最適のモデルとなりうる。

この出願の前記(3)の発明は、前記発明(1)のヒト遺伝子大量発現動物に抗アレルギー薬候補物質を投与し、この動物のアレルギー反応を測定することによって、候補物質の個体内活性を試験する方法である。すなわち、前記発明(1)のトランスジェニック動物は、H-PGD<sub>2</sub>Sを大量に保有することによってPGD<sub>2</sub>を



大量に産生するため、各種のアレルゲンに対して敏感に反応する。従って、例えば、任意のアレルゲンを事前に投与し、次いで、抗アレルギー薬の候補物質を投与して、動物の全身アレルギー反応を測定することによって、候補物質の薬効を評価することができる。

#### 【0012】

この出願の前記(4)の発明は、前記発明(1)のヒト遺伝子大量発現動物に睡眠調節のための候補物質を投与し、この動物の睡眠状態を測定することによって、候補物質の個体内活性を試験する方法である。すなわち、前記発明(1)のトランスジェニック動物は、H-PGDSを大量に保有することによってPGD<sub>2</sub>を大量に産生するため、その強い催眠作用により睡眠調節に変調をきたしている。従って、例えば、睡眠調節のための候補物質（例えば、覚醒状態を持続させる物質等）を投与して、動物の覚醒・睡眠状態を測定することによって、候補物質の薬効を評価することができる。覚醒・睡眠状態の測定は、活動量や摂食・節水量を計測したり、あるいは脳波や筋電位等の生理的指標を計測することによって行うことができる。

#### 【0013】

以下、実施例を示して前記の発明をさらに詳細かつ具体的に説明するが、この出願の発明は以下の例によって限定されるものではない。

#### 【0014】

##### 【実施例】

##### 実施例 1

##### (1) トランスジェニックマウスの作製

ヒト細胞のmRNAから調製したcDNAライブラリーから、ラットH-PGDS遺伝子のcDNAをプローブとしてヒトH-PGDSのcDNAをクローニングした。

#### 【0015】

次にベクター（pCAGGS）のクローニング部位（Sal I/Not I）にヒトH-PGDSのcDNAを挿入結合し、導入ベクターを構築した。図1は、この導入ベクターにおける導入遺伝子の構成である。



【0016】

この導入ベクターをマイクロインジェクション法によってFVBマウスの受精卵に注入した。遺伝子導入受精卵は定法に従って仮親の卵管に移植し、個体へと発生させ出生させた。

【0017】

得られたマウス個体の尾部からDNAを抽出し、導入遺伝子の配列にもとづき合成されたプローブを用い、サザン解析法によりトランスジェニックマウスを選別した。H-PGDS遺伝子の発現量のことなる独立した3系統のトランスジェニックマウスを確立した。結果は図2に示したとおりである。

#### (2) トランスジェニックマウスの遺伝子発現の検討

トランスジェニックマウスの全身における導入遺伝子の発現をサザン解析法により調べた。その結果S55マウスにおいて、H-PGDS遺伝子は骨格筋、心臓、肺、大腸、肝臓に高レベルで発現していることが確認された。結果は図3に示したとおりである。

#### (3) トランスジェニックマウスのPGD酵素活性の検討

トランスジェニックマウスの各種臓器におけるPGD酵素活性を、基質であるPGH<sub>2</sub>を用いて調べた。各種臓器においてトランスジェニックマウスでは酵素活性に著しい増加がみられた。また3系統間で比較したところ、S55>S41>>S66の順で酵素活性の増加が観察された。結果は図4に示したとおりである。

#### 実施例2

実施例1で得たトランスジェニックマウスを用い、ヒト喘息のモデルである抗原誘発肺炎モデルにおいて解析を行った。

【0018】

トランスジェニックマウスでは抗原チャレンジ後の好酸球の肺への浸潤が、野性型に比べ有意に増加していることが観察された。結果は図5に示したとおりである。

【0019】

以上の結果から、この発明のトランスジェニックマウスはアレルギー発症の機



構を解明するためのモデル動物として有用であり、新規抗アレルギー物質をスクリーニングする系として有効であることが確認された。

### 実施例 3

実施例 1 で得たトランスジェニックマウスにリポポリサッカロイドを腹腔内投与し、炎症時の睡眠発作における解析を行った。

#### 【0020】

高濃度 (20  $\mu$ g/kg) のリポポリサッカロイドを投与後、トランスジェニックマウスの自発的行動量を観察したところ、野性型に比べ有意に低下していた。このことはトランスジェニックマウスにおいては睡眠時間が増加していることを示唆するものである。結果は図 7 に示したとおりである。

#### 【0021】

以上の結果から、この発明のトランスジェニックマウスは睡眠誘発の機構を解明するためのモデル動物としても、また睡眠・覚醒リズムの新規調節物質をスクリーニングする系としても有効であることが確認された。

#### 【0022】

#### 【発明の効果】

以上詳しく説明したとおり、この発明によって、H-PGDS を大量発現するトランスジェニック動物が提供される。これらの動物によって、ヒト各種疾患の治療薬剤等の開発が促進される。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【図 1】

この発明のトランスジェニックマウスの作成に用いた導入ベクターの構造を示す模式図である。

#### 【図 2】

3 系統のトランスジェニックならびに野性型マウスの各種臓器より抽出した mRNA のノーザンプロット解析の結果である。

#### 【図 3】

トランスジェニックマウスの全身臓器から抽出した mRNA のノーザンプロット解析の結果である。



【図 4】

3 系統のトランスジェニックならびに野性型マウスの各種臓器より抽出したタンパク質分画を用いた、H-P G D S 酵素活性の結果である。

【図 5】

抗原に免疫を施したトランスジェニックならびに野性型マウスに生理的食塩水もしくは抗原を暴露した後の肺胞洗浄液中の炎症性細胞の細胞数を計測した結果である。

【図 6】

トランスジェニックならびに野性型マウスにリポポリサッカロイド (20 mg/kg) を腹腔内投与し後に、12時間の自発的行動量を測定した結果である。



特平 1 1 - 2 8 4 6 1

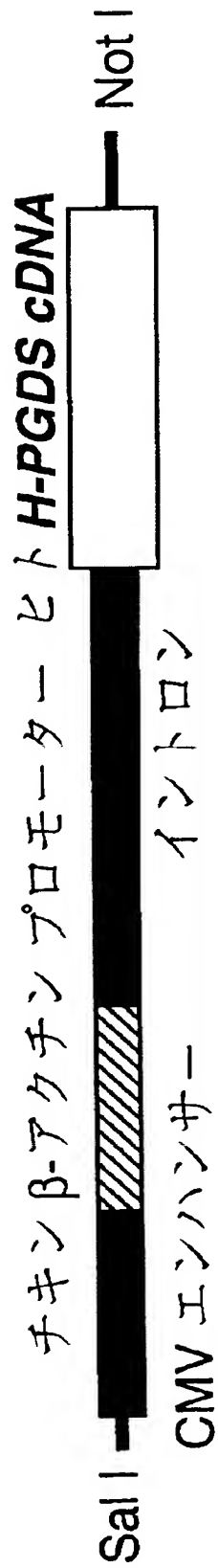
【書類名】

図面

【図 1】



# H-PGDS 導入ベクターの構造

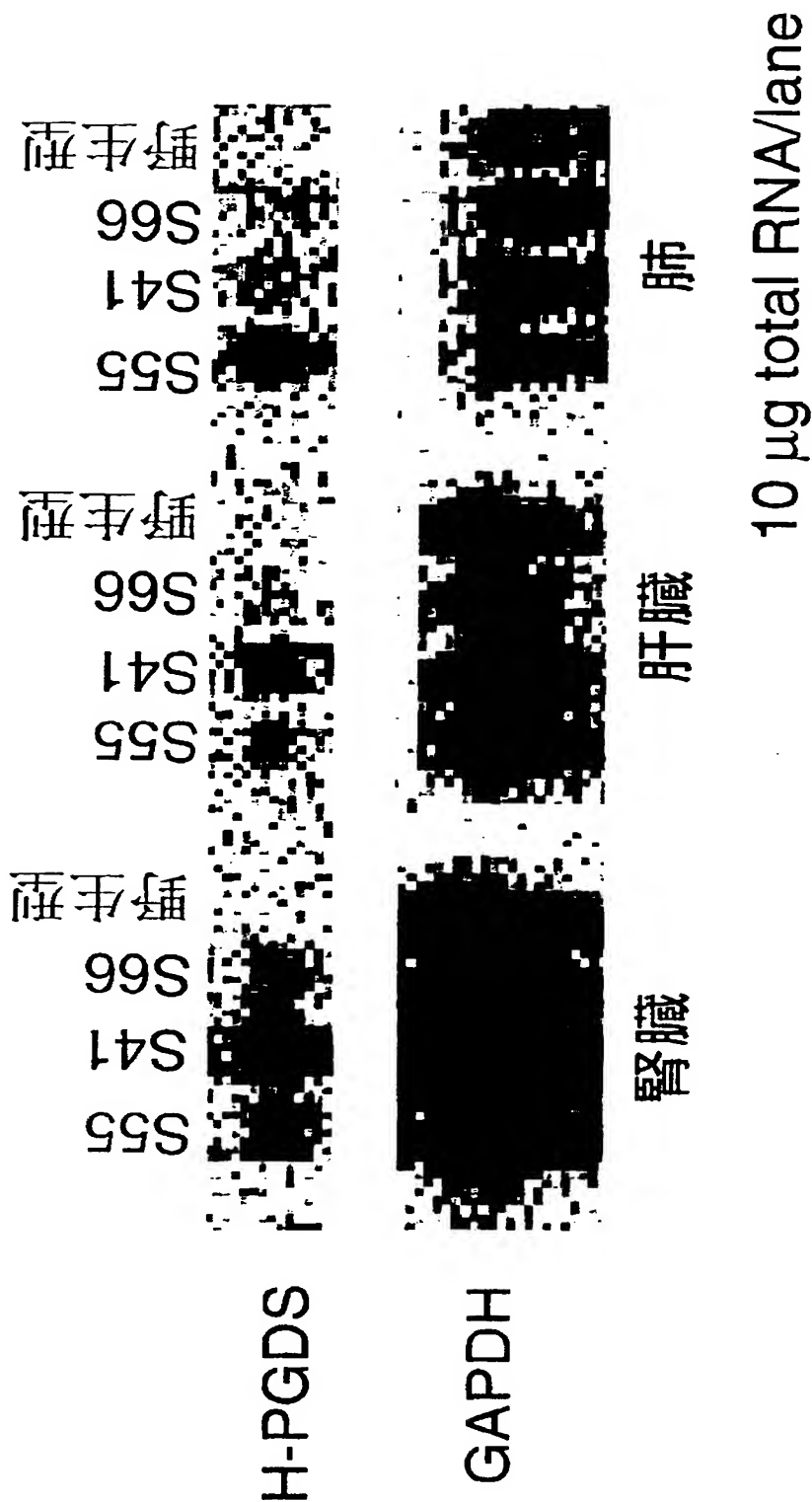




【図 2】



# 3系統のトランスジェニックマウスの遺伝子発現





【図 3】

トランスジェニックマウスにおける H-PGDS 遺伝子の組織分布

脳 肺 心臓 脾臓 肝臓 腎臓 小腸 大腸 睾丸 副睾丸 皮膚 骨格筋 胸膜

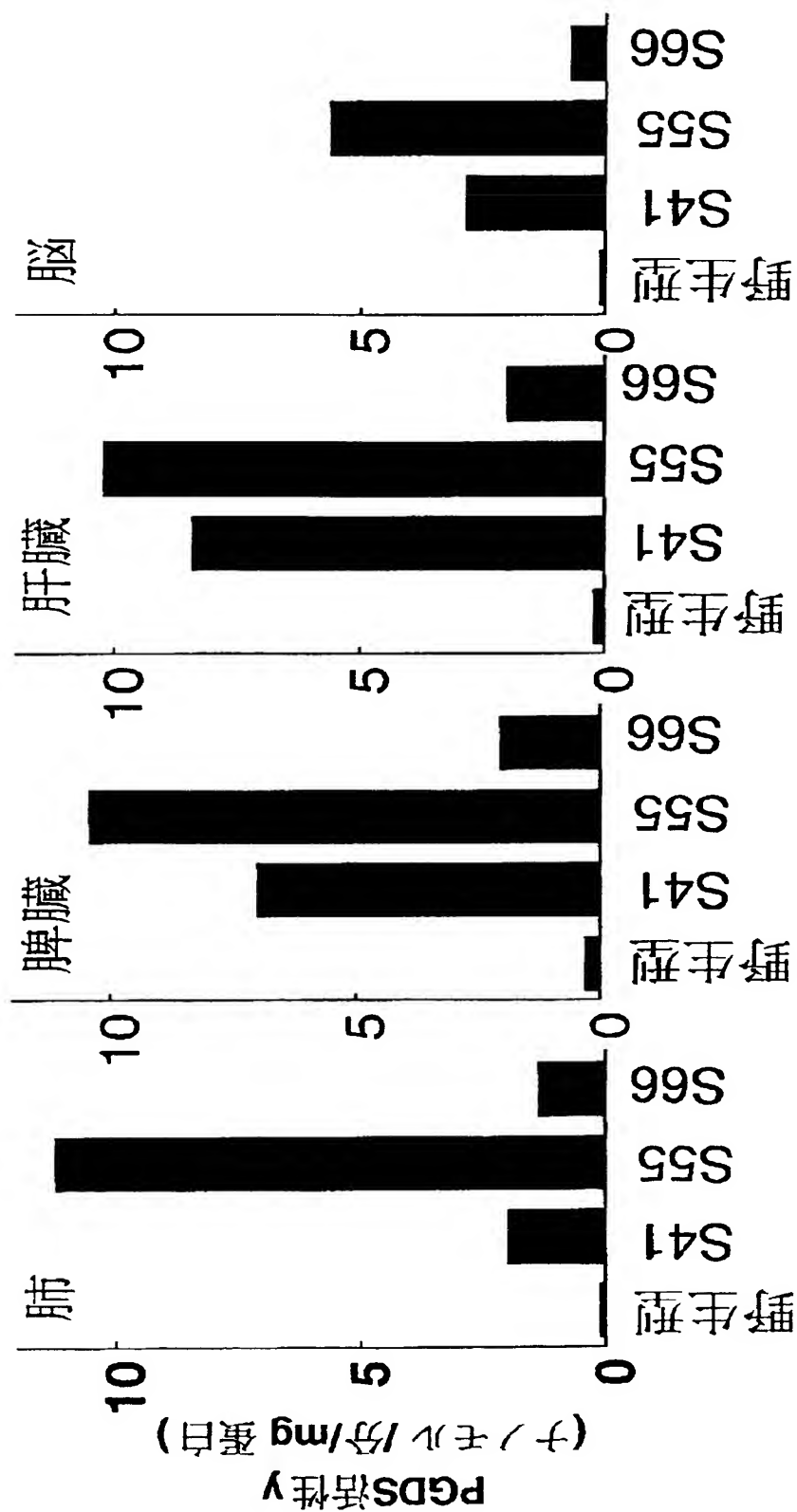


10  $\mu$ g total RNA/lane

【図 4】



トランスジェニックマウスにおける H-PGDS 酵素活性



特平 11-284610

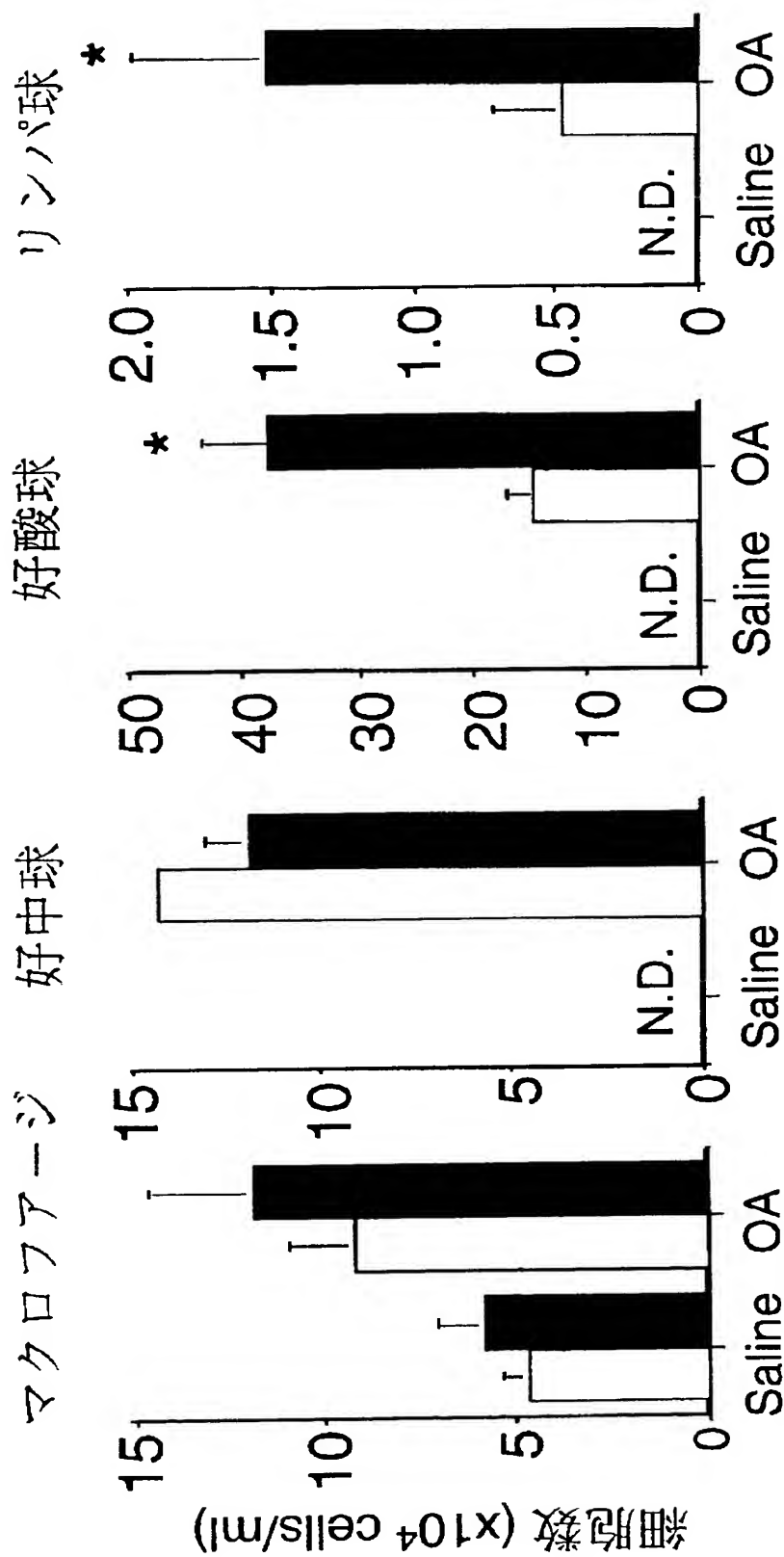


【図 5】



# H-PGDS TG マウスにおける抗原誘発肺炎症の増悪

□ 野生型      ■ トランスジェニックマウス

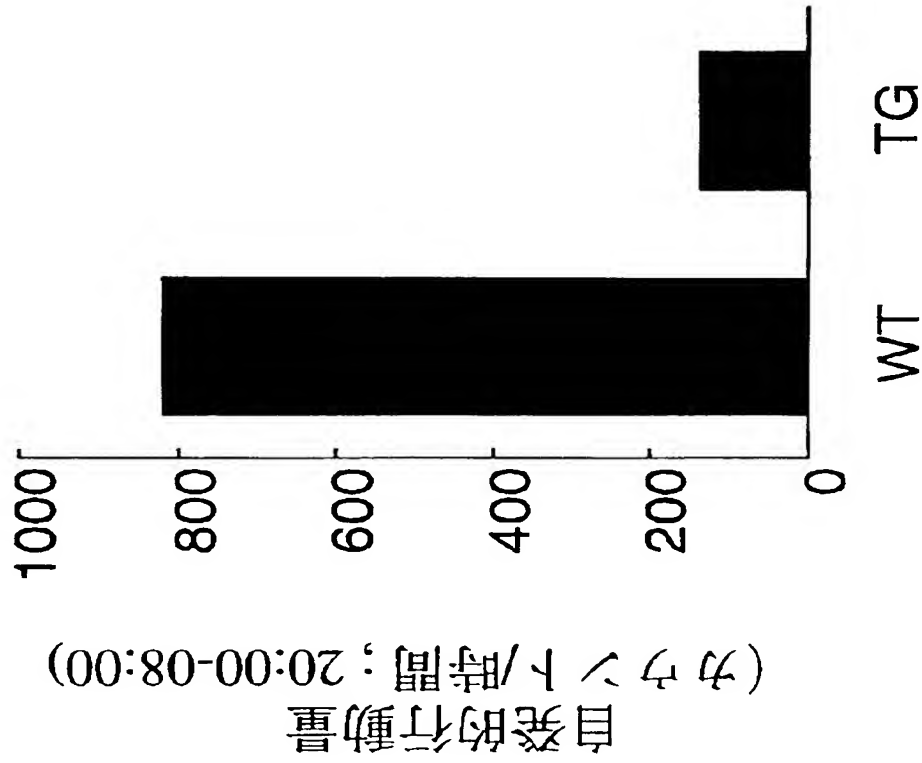


特平 11-284610



【図 6】

リポポリサッカロイド刺激後の自発的行動量





【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 遺伝的にヒト・プロスタグランジンD<sub>2</sub>を大量に発現している非ヒト動物、この動物を用いた各種試験方法を提供する。

【解決手段】 ヒト・プロスタグランジンD<sub>2</sub>合成酵素遺伝子を導入した非ヒト動物の全能性細胞を個体発生して得られる非ヒト動物およびその子孫動物であって、体細胞染色体中に上記遺伝子を保有し、ヒト・プロスタグランジンD<sub>2</sub>合成酵素を大量発現することを特徴とするヒト遺伝子大量発現動物と、この動物を用いて、抗アレルギー薬候補物質および睡眠調節物質の個体内活性を試験する方法。

【選択図】 なし



職権訂正履歴（職権訂正）

特許出願の番号	平成11年 特許願 第284610号
受付番号	59900976025
書類名	特許願
担当官	田中 則子 7067
作成日	平成11年10月19日

<訂正内容1>

訂正ドキュメント

書誌

訂正原因

職権による訂正

訂正メモ

【特許出願人】財団法人大阪バイオサイエンス研究所の識別番号を訂正しました。

訂正前内容

【特許出願人】

【識別番号】 396000745

【氏名又は名称】 財団法人大阪バイオサイエンス研究所

訂正後内容

【特許出願人】

【識別番号】 390000745

【氏名又は名称】 財団法人大阪バイオサイエンス研究所



認定・付加情報

特許出願の番号	平成 1 1 年 特許願 第 2 8 4 6 1 0 号
受付番号	5 9 9 0 0 9 7 6 0 2 5
書類名	特許願
担当官	第二担当上席 0 0 9 1
作成日	平成 1 1 年 1 0 月 2 6 日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】	396020800
【住所又は居所】	埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号
【氏名又は名称】	科学技術振興事業団

【特許出願人】

【識別番号】	390000745
【住所又は居所】	大阪府吹田市古江台 6 丁目 2 番 4 号
【氏名又は名称】	財団法人大阪バイオサイエンス研究所

【特許出願人】

【識別番号】	000103840
【住所又は居所】	東京都板橋区小豆沢 3 丁目 6 番 1 0 号
【氏名又は名称】	オリエンタル酵母工業株式会社

【代理人】

【識別番号】	申請人
【識別番号】	100093230
【住所又は居所】	東京都渋谷区宇田川町 3 7 - 1 0 麻仁ビル 6 階 西澤国際特許事務所
【氏名又は名称】	西澤 利夫



出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 3 9 6 0 2 0 8 0 0 ]

1. 変更年月日 1 9 9 8 年 2 月 2 4 日  
[変更理由] 名称変更  
住 所 埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号  
氏 名 科学技術振興事業団



出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000103840]

1. 変更年月日	1990年 8月28日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都板橋区小豆沢3丁目6番10号
氏 名	オリエンタル酵母工業株式会社



出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [390000745]

1. 変更年月日 1990年 9月21日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府吹田市古江台6丁目2番4号

氏 名 財団法人大阪バイオサイエンス研究所